

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2003)11-03-0234-04

辛伐他汀对内皮细胞株 ECV-304 细胞 分化抗原 40 诱导表达的影响

张 敏, 陈桢月, 陆国平, 吴春芳

(上海第二医科大学附属瑞金医院内科实验室, 上海市 200025)

[关键词] 细胞生物学; 药物干预研究; 流式细胞术; 细胞分化抗原 40; 辛伐他汀; 动脉粥样硬化; 内皮细胞

[摘要] 为研究在人脐静脉内皮细胞中, 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂(即他汀类药物)对细胞因子诱导的细胞分化抗原 40 表达的影响, 采用培养的人脐静脉内皮细胞株 ECV-304, 联合应用肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 作为刺激剂, 用不同浓度辛伐他汀干预, 并用流式细胞仪和逆转录-聚合酶链反应测定细胞分化抗原 40 的表达。结果发现, 联合应用肿瘤坏死因子 α 100 kU/L 和干扰素 γ 1 500 kU/L, 可使 ECV-304 细胞株细胞分化抗原 40 的表达明显增加, 并有一定的时效关系, 单独使用肿瘤坏死因子 α 或干扰素 γ 则效果不明显; 辛伐他汀可减少肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 所诱导的细胞分化抗原 40 的表达, 随着辛伐他汀药物浓度增加(0~10 μ mol/L), 细胞分化抗原 40 表达逐渐减少, 呈一定的剂量依赖性。由此提示他汀类药物治疗动脉粥样硬化的抗炎和抗免疫机制中可能有细胞分化抗原 40 系统的参与。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effect of Simvastatin on Cluster of differentiation 40 Expression Induced by Tumor Necrosis Factor α /Interferon γ in ECV-304 Cell

ZHANG Min, CHEN Zhen Yue, LU Guo Ping, and WU Chun Fang

(Department of Cardiology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

[KEY WORDS] CD40/CD40L; Simvastatin; Atherosclerosis; Endothelial Cell; Anti-inflammatory; Immunological Effect

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of simvastatin on CD40 expression induced by tumor necrosis factor α (TNF- α) and interferon γ (IFN- γ). **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (hUVECs) cell line (ECV-304) were cultured with simvastatin (0~10 μ mol/L), and stimulated with 100 kU/L TNF- α and 1 500 kU/L IFN- γ . We detected CD40 expression levels in hUVECs by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and flow cytometry (FCM) analysis.

Results In ECV-304, exposure to TNF- α (100 kU/L) plus IFN- γ (1 500 kU/L) resulted in a marked increase in CD40 expression; CD40 mRNA expression reached a maximum at 9 h, and protein at 20 h. Simvastatin attenuated the expression of CD40 exposed to TNF- α (100 kU/L) plus IFN- γ (1 500 kU/L) in a dose-dependent manner, with a maximal effect at concentration of 10 μ mol/L. On mRNA level, relative intensity quantification compared with basal were 90.9% \pm 38.8% vs 228.0% \pm 49.6% ($P < 0.05$); on protein level, CD40⁺ cells ratio were 20.1% \pm 1.3% vs 54.1% \pm 6.1% ($P < 0.05$). **Conclusions** Simvastatin can inhibit CD40 expression induced by TNF- α /IFN- γ . These results may have important implications for mechanism of anti-inflammatory and immunological effect of statins.

大量证据表明动脉粥样硬化是一种有免疫系统参与的慢性炎症性疾病, 免疫介质细胞分化抗原 40 (cluster of differentiation, CD40) 与其配体——CD40 配基 (CD40L 或 CD154) 之间的相互作用参与了动脉粥样硬化的发生发展过程^[1]。他汀类药物即 3-羟-3-

甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂已被广泛应用于冠心病的一级预防和二级预防。大量研究资料表明, 他汀类药物的这种临床效应不完全依赖于其调脂作用, 然而他汀类药物抑制动脉粥样硬化发生发展过程的机理尚未完全阐明。他汀类药物能否通过干预冠心病患者细胞分化抗原 40 系统, 进而抑制炎症反应和血栓形成、延缓动脉粥样硬化的进展, 国内外鲜有文献报道, 本文对此进行了研究。

[收稿日期] 2002-09-27

[修回日期] 2002-09-27

[作者简介] 张敏, 女, 1975 年出生, 山东省东营市人, 在读硕士研究生, 现从事冠状动脉粥样硬化发病机理及他汀类药物非调脂作用的研究, 联系电话: 13661561433 或 021-64370045-665356, E-mail: surlab@hotmail.com。陆国平, 男, 1952 年出生, 上海市人, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 从事血脂代谢与冠状动脉硬化及他汀类药物作用的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI-1640 培养基购自美国 GIBCO 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;琼脂糖购自美国 AM-RESCO 公司;poly(dF-dC)·poly(dF-dC) 购自 Amersham Pharmacia Biotech;培养器皿购自 Costar;重组人肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α) 购自 BD 公司;人重组干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ) 购自 Pepro-Tech; FITC 标记的鼠抗人抗 CD40 单克隆抗体购自 BD 公司;Trizol 和 DEPC 购自美国 GIBCO 公司;M-MLV 逆转录酶、随机引物和 dNTP 购自美国 Promega 公司;RNA 酶抑制剂(Rnasin) 购自上海华美生物技术公司;Taq 酶购自加拿大 Biostar 公司;辛伐他汀纯品购自 LKT Laboratories。人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞株购自中科院细胞所。

辛伐他汀药物原料药的处理:将脂溶性辛伐他汀原料药 4.3259 mg(相对分子质量 432.59)溶于 100 μ L 无水乙醇,再加入 150 μ L 氢氧化钠(0.1 mol/L),50 $^{\circ}$ C 温育 2 h 后,用 0.1 mol/L 盐酸调 pH 值至 7.2,加双蒸水至 1 mL,即得终浓度为 10 mmol/L 的储存液,进一步用 PBS 稀释储存于 4 $^{\circ}$ C^[2]。

1.2 细胞培养及干预

将 ECV-304 细胞种至 6 孔板内,用含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24~48 h,在高倍显微镜下观察,发现细胞贴壁生长,并有 50%~80% 汇合。再用无小牛血清(BSA)1640 培养基替换完全培养基,37 $^{\circ}$ C、CO₂ 孵育过夜。

干预一:ECV-304 细胞用 TNF- α 100 kU/L 和 IFN- γ 1 500 kU/L 干预,观察不同时间点 CD40 的表达(6、9、12、15 和 18 h 观察 CD40 mRNA 表达,6、12、20 和 24 h 观察 CD40 蛋白表达),以相同时间的不加刺激剂组为对照。干预二:在 6 孔板中加入不同浓度的辛伐他汀(0、1、2.5、5、7.5 和 10 μ mol/L),37 $^{\circ}$ C、CO₂ 预孵育 16~18 h 后,选择上述实验中最佳作用时间点,用 TNF- α 100 kU/L 和 IFN- γ 1 500 kU/L 作用相应时间,同上检测 CD40 表达。每次实验至少重复 3 次。

1.3 流式细胞仪检测细胞分化抗原 40 的表达

收集细胞,PBS 洗净。在每管细胞中加入 10 μ L FITC 标记的 CD40 单抗,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。洗去未结合抗体,用 200 μ L PBS 重悬;流式细胞仪检测,Cell Quest 软件分析,计算 CD40⁺ 标记细胞数比率。

1.4 RNA 的提取及逆转录—聚合酶链反应

采用逆转录—聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 CD40 的 mRNA 表达。用 Trizol 抽提总 RNA,紫外分光光度

计测定浓度。取 RNA 2 μ g,随机引物 0.5 μ L, Rnasin 1 μ L,加 DEPC 水至 10 μ L,65 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后立即冰浴。加 M-MLV 1 μ L、缓冲液 4 μ L 和 10 nmol/L dNTP 1 μ L,加 DEPC 水至 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 1 h 后,95 $^{\circ}$ C 5 min 灭活逆转录酶。PCR 扩增 CD40 片段(380 bp),以 β -actin(532 bp)作内参照。引物序列:CD40 上游:5'-CAGAGTTCCTGAAACGGAATGCC-3',下游:5'-TGCCTGCCTGTTGCACAACG-3', β -actin 上游:5'-AAGGATTCCTATGTGGG-3',下游:5'-CATCTCTTGCTCGAAGTC-3'(以上序列由上海生物工程有限公司合成)。反应体系:双蒸水 35.5 μ L、Taq 酶 0.5 μ L、缓冲液 5 μ L、MgCl₂ 2 μ L、c 糖尿病肾病 A 2 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L、10 mmol/L dNTP 1 μ L。反应条件:CD40 为 94 $^{\circ}$ C 4 min 后开始循环,94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 62 $^{\circ}$ C 45 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min,共 28 循环,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 充分延伸; β -actin 为 94 $^{\circ}$ C 4 min 后开始循环,94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 45 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 循环,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 充分延伸。琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 统计分析

每个实验步骤至少重复 3 次,均获得一致的结果。各次实验的最终结果用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)作为统计资料。统计分析用 t 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 诱导细胞分化抗原 40 的表达

在无任何刺激剂干预时,培养的 ECV-304 细胞仅有 CD40 的低水平表达;联合应用 TNF- α 100 kU/L 和 IFN- γ 1 500 kU/L,可使 ECV-304 细胞 CD40 的表达明显增加。单独使用 TNF- α 或 IFN- γ 则效果不明显。在 mRNA 水平,CD40 的表达在细胞因子刺激后 9 h 达到高峰;在蛋白水平,CD40 表达则于刺激后 20 h 达到高峰(表 1, Table 1)。

2.2 辛伐他汀对 ECV-304 细胞分化抗原 40 诱导表达的影响

ECV-304 用不同浓度辛伐他汀(0~10 μ mol/L)共孵育 16~18 h 后,加入 TNF- α 100 kU/L 和 IFN- γ 1 500 kU/L 继续培养,9 min 后 RT-PCR 检测 CD40 mRNA 的表达水平,20 h 流式细胞技术检测 CD40 蛋白表达水平。结果表明辛伐他汀可减少 TNF- α 和 IFN- γ 所诱导的 CD40 的表达,并呈一定的剂量依赖性(表 2 和图 1, Table 2 和 Figure 1)。

表 1. 肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 诱导细胞分化抗原 40 表达的时效关系($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1. Time-dependent manner of CD40 expression induced by TNF-α/IFN-γ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 时 间 | CD40 mRNA(%) | | 时 间 | CD40 蛋白(%) | |
|------|--------------|-------------------------|-------|------------|-----------------------|
| | 基础对照组 | TNF-α/IFN-γ 组 | | 基础对照组 | TNF-α/IFN-γ 组 |
| 未干预 | 91.9±17.0 | | 未干预 | 3.8±0.8 | |
| 6 h | 82.0±13.5 | 147.0±23.2 ^b | 6 小时 | 4.8±1.0 | 16.6±6.5 |
| 9 h | 81.5±7.2 | 231.8±12.0 ^b | 12 小时 | 5.3±1.3 | 28±9.0 ^a |
| 12 h | 87.3±17.1 | 154.1±20.2 ^a | 20 小时 | 4.8±1.0 | 68±9.2 ^b |
| 15 h | 86.5±12.3 | 122.3±22.0 | 24 小时 | 4.3±0.6 | 60.4±9.7 ^a |
| 18 h | 89.2±14.7 | 94.7±15.8 | | | |

与基础对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 。

表 2. 辛伐他汀对 ECV-304 细胞分化抗原 40 诱导表达的量效关系($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2. Dose-dependent manner of simvastatin on CD40 expression induced by TNF-α/IFN-γ in ECV-304 cell

| 辛伐他汀浓度 | CD40 mRNA(%) | CD40 蛋白(%) |
|-------------|-------------------------|-----------------------|
| 未用药 | 228.0±49.6 | 54.1±6.1 |
| 1.0 μmol/L | 198.9±22.5 | 37.8±1.8 ^b |
| 2.5 μmol/L | 181.2±56.5 ^a | 33.2±3.7 ^b |
| 5.0 μmol/L | 128.3±27.4 ^b | 31.6±9.4 ^b |
| 7.5 μmol/L | 131.9±40.9 ^b | 23.0±1.3 ^b |
| 10.0 μmol/L | 90.6±39.3 ^b | 20.1±1.3 ^b |

与未用药组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 。

3 讨论

细胞分化抗原 40 是肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族成员,可在 B 淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞及内皮细胞中表达。CD40L 则是 TNF 基因超家族的成员,它存在于激活的 CD4 阳性(CD4⁺)的 T 淋巴细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和血管平滑肌细胞及血小板中^[4]。CD40/CD40L 在体液免疫和细胞免疫中是一条重要的细胞信号传导途径,近年大量研究表明 CD40 信号不仅参与了免疫反应调节,还促进了动脉粥样硬化的发生发展过程;阻断 CD40 与 CD40L 的相互作用,不仅能够抑制小鼠动脉粥样硬化的发生发展,而且能改变斑块的生物学特性和结构,增加斑块的稳定性^[5],进一步证实 CD40/CD40L 信号在动脉粥样硬化中的作用。

目前公认动脉粥样硬化是一种炎症性疾病,致炎因子使内皮细胞激活而引起的炎症反应是促使动脉粥样硬化发生发展的关键因素。某些促动脉粥样

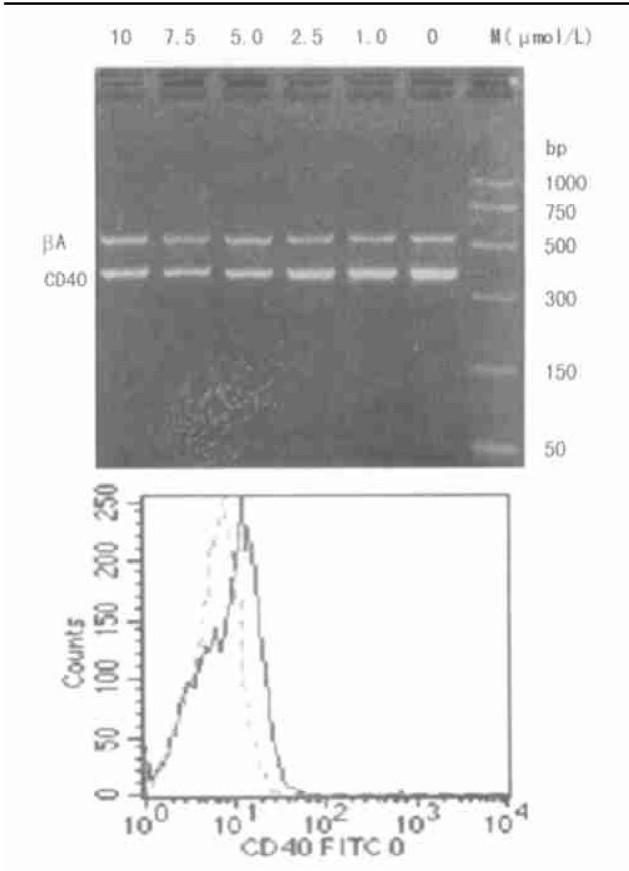


图 1. 辛伐他汀对 ECV-304 细胞分化抗原 40 诱导表达的影响 B 中实线为辛伐他汀干预前 CD40 蛋白水平,虚线为辛伐他汀 10 μmol/L 干预后 CD40 蛋白水平。

Figure 1. Effect of simvastatin on CD40 expression induced by TNF-α/IFN-γ in ECV-304 cell

硬化的致炎因子如 IFN-γ、IFN-β 及 TNF-α 等均可使内皮细胞 CD40 表达增加。本研究证实培养的 ECV-304 细胞无刺激剂干预时可有 CD40 的少量表达,细胞因子 TNF-α 或 IFN-γ 均可轻度增加其表达,联合应用 TNF-α 和 IFN-γ 则使 CD40 的表达明显升高,与

文献[6]研究结果一致。另有研究发现在小鼠的血管平滑肌细胞^[7]和巨噬细胞^[8]中,联合应用这两种细胞因子同样使 CD40 的表达明显增加,并且进一步指出 TNF- α 可通过转录因子核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 而 INF- γ 通过活性蛋白-1 (active protein 1, AP-1) 使平滑肌细胞或巨噬细胞表达 CD40,联合应用两种刺激剂则会对这两种转录因子产生联合作用,进而使 CD40 表达大幅度提高。

目前应用的抗动脉粥样硬化治疗中较为肯定的是降脂治疗,特别是他汀类调脂药物。晚近研究发现,他汀类药物降低冠状动脉事件发生的机理除了其降脂作用外,还有抗炎作用。另外还可能通过抗氧化、改善内皮功能和抗凝血特性而起到减少心脏事件发生的作用^[9]。这种作用可能与 NF- κ B 的活性下降有关^[10]。最近研究发现 CD40 通过与其配基 CD154 结合,激发细胞内信号转导途径而使 NF- κ B 激活^[11],然而他汀类药物发挥抗炎和抗免疫作用的机理是否包括干预冠心病病人 CD40/CD154 系统,目前鲜有文献报道。

Garlichs 等^[11]通过对 15 例中度高胆固醇血症男性病例的体内实验研究指出,短期口服 cerivastatin 可使外周血单核细胞 CD40 表达明显减少。而最近另一项体内实验研究指出,他汀类药物治疗可显著降低伴有高凝状态高胆固醇血症病人的血 sCD40L 水平^[12]。即体内实验证明应用他汀类药物可使外周血细胞中或血浆中的 CD40-CD40L 减少,但该效应是否是他汀类药物对 CD40 表达的直接抑制及作用机制,目前国内外对该方面的研究很少。在静态培养下的人类脐静脉内皮细胞仅有 CD40 而无 CD40L 的表达,因此,本研究选用该细胞来观察他汀类药物对 CD40 在 mRNA 水平和蛋白水平表达的直接作用,从而探讨他汀类药物对 CD40/CD40L 系统的影响。蒋学华等^[13]在辛伐他汀药物动力学及生物利用度的研究中指出,反相高效液相色谱法测定辛伐他汀胶囊剂(40 mg)和片剂(40 mg)的血药浓度最高值分别为 25.63 ± 5.09 与 28.14 ± 8.31 μ g/L,因此,1 μ mol/L 辛伐他汀则相当于病人服用辛伐他汀 40 mg/天时体内最高血药浓度的 15~17 倍,但因辛伐他汀是一种脂溶性药物,故在体内有可能通过被动扩散而在内皮细胞积聚,从而远远超过了血药浓度。因此,本体外实验选用辛伐他汀 1~10 μ mol/L

干预内皮细胞,结果表明,辛伐他汀共孵育可显著降低上述细胞因子所诱导的 CD40 的表达,并呈一定的剂量依赖性。我们推测他汀类药物可能干预 CD40 诱导的促动脉粥样硬化过程,这种干预 CD40 系统的作用也可认为是它的一种抗炎作用。因此,CD40/CD40L 系统可能参与了他汀类药物的抗炎过程。但他汀类药物是如何干预了 CD40/CD40L 信号转导途径,及干预了该途径的那一环节尚待进一步研究。

总之,本文通过体外实验证实他汀类药物可以减少细胞因子诱导的 CD40 的表达,提示他汀类药物的抗炎和抗免疫过程中可能有 CD40/CD40L 系统的参与,对于进一步阐明他汀类药物的作用机理具有重要的意义。

[参考文献]

- [1] Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res*, 2001, **89** (12): 1 092-103
- [2] Sadeghi MM, Collinge M, Pardi R, Bender JR. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. *J Immunol*, 2000, **165** (5): 2 712-718
- [3] Locksley R, Killeen N, Lenardo M. The TNF and TNF receptor super-families: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001, **104** (4): 487-501
- [4] Garlichs C D, Eskafi S, Raaz D, Schmidt A, Ludwig J, Hermann M, et al. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart*, 2001, **86** (6): 649-655
- [5] Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, et al. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (13): 7 458-463
- [6] Wagner AH, Gebauer M, Pollok-Kopp B, Hecker M. Cytokine-inducible CD40 expression in human endothelial cells is mediated by interferon regulatory factor 1. *Blood*, 2002, **99** (2): 520-525
- [7] Krzesz R, Wagner AH, Cattaruzza M, Hecker M. Cytokine-inducible CD40 gene expression in vascular smooth muscle cells is mediated by nuclear factor κ B and signal transducer and activation of transcription 1. *FEBS Lett*, 1999, **453** (1-2): 191-196
- [8] Nguyen VT, Benveniste EN. Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon- γ induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J Biol Chem*, 2000, **275** (31): 23 674-684
- [9] 杨志明,肖传实,边云飞,梁树芬,王凤芝,王友桂. 辛伐他汀对冠心病患者低密度脂蛋白氧化修饰及血小板活化状态的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 161-163
- [10] Puddu P, Puddu GM, Muscare A. HMG-CoA reductase inhibitors: is the endothelium the main target? *Cardiology*, 2001, **95** (1): 9-13
- [11] Garlichs CD, John S, Eskafi S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, et al. Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation*, 2001, **104** (20): 2 395-400
- [12] Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Di Febbo C, Nutini M, Fazio M, et al. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation*, 2002, **106** (4): 399-402
- [13] 蒋学华,朱浩,陈得光,程强,王亮. 辛伐他汀药物动力学及生物利用度. *中国临床药学杂志*, 2000, **9** (5): 289-291

(此文编辑 朱雯霞)